



Guided Search

[new search](#)[favorites](#)[settings](#)[cost](#)[logout](#)[help](#)

Dynamic Search: JAPIO - Patent Abstracts of Japan

Records for: JP 4197182

[save as alert...](#)[save strategy only...](#)

Output

Format:

Full Record

Destination:

Browser

[display/send](#)

Modify

[refine search](#)[back to picklist](#)select
all none

Records 1 of 1 In full Format

1. 1/19/1

03832082 **Image available**

DNA CODING ALKALINE PROTEASE YA ENZYME AND PRODUCTION OF ALKALINE F
THE DNA

Pub. No.: 04-197182 [JP 4197182 A]

Published: July 16, 1992 (19920716)

Inventor: TOBE SEIICHI

ODERA MOTOYASU

ASAI YOSHIO

Applicant: LION CORP [000676] (A Japanese Company or Corporation), JP (Japan)

Application No.: 02-327110 [JP 90327110]

Filed: November 28, 1990 (19901128)

INTL CLASS: International Class: 5] C12N-015/57; C11D-003/386; C12N-009/54; C12I
C12N-009/54; C12R-001/07JAPIO Class: 14.5 (ORGANIC CHEMISTRY -- Microorganism Industry); 14.1 (ORGANIC C
Compounds); 14.6 (ORGANIC CHEMISTRY -- Liquid Fuel, Oils & Fats)

Journal: Section: C, Section No. 1000, Vol. 16, No. 524, Pg. 33, October 28, 1992 (1992102

ABSTRACT

NEW MATERIAL: DNA coding alkaline protease Ya enzyme.

EXAMPLE: The DNA having the amino acid sequence of formula.

USE: Production of alkaline protease Ya, etc.

PREPARATION: The DNA can be produced by gene recombination technique.

AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyr

21

GlyGlnGlyGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArg

41

SerMetHisGluAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAlaLeuGly

61

AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlySerValLeu

81

LeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerIleMet

101

GlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAla

121

GlyAlaArgIleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyr

401

ValPheIleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAla

421

433

ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlaIleValHis

⑫ 公開特許公報(A)

平4-197182

⑤ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成4年(1992)7月16日

C 12 N 15/57
 C 11 D 3/386
 C 12 N 9/54
 // C 12 N 15/57
 C 12 R 1:07)
 (C 12 N 9/54
 C 12 R 1:07)

ZNA

7614-4H
 7823-4B

8717-4B C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 9 (全17頁)

⑭ 発明の名称 アルカリプロテアーゼ Y a 酵素をコードする DNA 及び該 DNA を
 用いたアルカリプロテアーゼ Y a の製造方法

⑮ 特 願 平2-327110

⑯ 出 願 平2(1990)11月28日

⑰ 発 明 者 戸 部 聖 一 神奈川県中郡二宮町山西457
 ⑱ 発 明 者 大 寺 基 靖 神奈川県平塚市日向岡2-2-34
 ⑲ 発 明 者 浅 井 芳 男 神奈川県中郡二宮町百合が丘2-23-3
 ⑳ 出 願 人 ライオン株式会社 東京都墨田区本所1丁目3番7号
 ㉑ 代 理 人 弁理士 中 村 稔 外 8 名

明 記 書

1. 発明の名称 アルカリプロテアーゼ Y a 酵素
 をコードする DNA 及び該 DNA
 A を用いたアルカリプロテアー
 ゼ Y a の製造方法

2. 特許請求の範囲

- (1) アルカリプロテアーゼ Y a 酵素をコードする
 DNA。
 (2) 下記のアミノ酸配列で特定される請求項1記
 載の DNA。

1 20
 AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAlaGlnAsnAsnTyrGlyLeuTyr
 21 40
 GlyGlnGlyGlnLeuValAlaValAlaAspThrGlyLeuAspThrGlyArgAsnAsnSer
 41 60
 SerMetHisGluAlaPheArgGlyLysIleThrAlaLeuTyrAlaLeuGlyArgThrAsn
 61 80
 AsnAlaSerAspProAsnGlyHisGlyThrHisValAlaGlySerValLeuGlyAsnAla
 81 100
 LeuAsnLysGlyMetAlaProGlnAlaAsnLeuValPheGlnSerIleMetAspSerSer
 101 120
 GlyGlyLeuGlyGlyLeuProSerAsnLeuAsnThrLeuPheSerGlnAlaTrpAsnAla
 121 140
 GlyAlaArgIleHisThrAsnSerTrpGlyAlaProValAsnGlyAlaTyrThrAlaAsn

141 160
 SerArgGlnValAspGluTyrValArgAsnAsnAspMetThrValLeuPheAlaAlaGly
 161 180
 AsnGluGlyProAsnSerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlaIleThr
 181 200
 ValGlyAlaThrGluAsnTyrArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnHis
 201 220
 IleAlaGlnPheSerSerArgGlyAlaThrArgAspGlyArgIleLysProAspValThr
 221 240
 AlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSerSerLeuAlaProAspSerSerPheTrp
 241 260
 AlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThrProIleVal
 261 280
 AlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluHisPheIleLysAsnArgGlyIleThrProLys
 281 300
 ProSerLeuIleLysAlaAlaLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeuGlyTyrPro
 301 320
 SerGlyAspGlnGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyrVal
 321 340
 AsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAla
 341 360
 GlyLysProLeuLysIleSerLeuValTrpThrAspAlaProGlySerThrThrAlaSer
 361 380
 TyrThrLeuValAsnAspLeuAspLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrVal
 381 400
 GlyAsnAspPheSerTyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAsn

401 420
ValPheIleAsnAlaProGlnSerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnVal
421 433
ProSerGlyProGlnArgPheSerLeuAlaIleValHis

(3) 下記のDNA配列で特定される請求項1記載のDNA。

1 60
AATGATGTAGCAAGAGGGATAGTAAAGCTGATGTTGCACAAAACAATTACGGATTATAT
61 120
GGACAAGGTCAACTAGTTGCAGTAGCGGACACAGGCTTAGATACAGGTCGTAACGATAGT
121 180
TCTATGCATGAAGCATTCCGCGGGAATACACAGCTCTTACGCGTTAGGAAGAATAAT
181 240
AATCGGAGTGTCCGAATGGGATGGCACACATGTAGCAGGTTCTGTACTTGGTAATGCT
241 300
TTAAATAAAGGAATGGCTCCGCAAGCTAAGTCTTCCAATCTATTATGGATAGCAGC
301 360
GGAGGATTAGGTGGCTTACCATCGAAGCTTAAATACGTTATTTAGTCAAGCTTGAATGCT
361 420
GGAGCAAGAATTCATACTAACTCTTGGGAGCCCCAGTAAATGGAGCGTACACTGCTAAC
421 480
TCGAGACAAGTGGATGAGTATGTTTGAATAATGATATGACGGTACTTTTTGCAGCTGGT
481 540
AATGAAGGTCCTAATTCAGGAACAATTAGTGCTCCAGGTACAGCGAAAATGCTATTACG

541 600
GTCGGCGCAACGCAAACTATCGCCCAAGCTTCGGTTCGATAGCAGATAACCCAAATCAT
601 660
ATTGCACAATTTTCATCGAGAGGAGCTACGAGGGATGGACGAATTAAGCCTGACGTAACA
661 720
GCTCCTGGAACTTTATTTTATCAGCAGCTTCTTCTTAGCTCCAGACTCTTCGTTTTGG
721 780
GCGAATTATAACAGTAAATACCGGTATATGGGGGTACCTCCATGGCGACACCTATTGTT
781 840
GCAGGGAATGTGGCAATTACGTGAGCATTATATAAAAAATAGAGGTATTACTCCTAAG
841 900
CCTTCTTTAATAAAAGCTGCACCTTATCGCTGGTGCTACTGATGTTGGTTTACGATATCCT
901 960
AGTGGTGACCAAGGCTGGGGCGGTACTCTAGATAAATCGTTAAATGTAGCGTATGTC
961 1020
AATGAAGCAACTGCATTAGCCACAGGACAAAAAGCAACGTATTCGTTCCAAGCACAAGCG
1021 1080
GGTAAACCTTTAAAAATCTCGTTAGTATGGACAGATGCTCCTGGAAGTACAACCTGCATCT
1081 1140
TATACACTAGTTAATGATTTAGATCTAGTTATTACTGCTCGAATGGACAAAAATATGTA
1141 1200
GGAAATGATTTTATGTTATCCTTATGATAATAACTGGGATGGTCCGAACAATGTTGAGAAC
1201 1260
GTATTTATAAACGCTCCGCAATCTGGAACGTATATAATTGAGGTTCAAGCGTATAATGTA
1261 1299
CCATCTGGCCCAAGCGTTTCTCACTAGCTATCGTACAT

(4) 請求項1又は2のDNAの上流に、中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域又はアミラーゼ遺伝子の転写及び翻訳に関する5'末端の非翻訳領域を有する請求項1記載のDNA。

(5) 請求項1～4のいずれか1項に記載のアルカリプロテアーゼY_a酵素をコードするDNAを含有するプラスミドDNA。

(6) 請求項5記載のプラスミドDNAを導入した微生物。

(7) 微生物がバチルス属細菌である請求項6記載の微生物。

(8) 請求項6又は7記載の微生物を培養することにより培養物からアルカリプロテアーゼY_aを採取することを特徴とするアルカリプロテアーゼY_aの製造方法。

(9) 微生物がバチルス属細菌であり、中性で培養する請求項8記載の製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れ、洗浄力の改善に寄与しうるY_a酵素（特開昭61-280278号）の遺伝子をコードするDNA断片及び該断片を含むプラスミドを導入した微生物を用いてY_a酵素を製造する方法に関する。

〔従来の技術〕

耐アルカリ性及び耐界面活性剤性に優れたY_a酵素は、通常のアルカリプロテアーゼが失活するような高pH液体洗浄剤に配合した場合でも、蛋白質分解活性を保持し、洗浄力の向上に寄与する能力を有している。Y_a酵素は、バチルス・エスピー Y株（*Bacillus* sp. Y）（微生物第8088号）を培養することにより、その培養物中に見いだすことができるが、通常の培養を行なってもその生産量は低くこの状態では工業的レベルでの計算は困難と言わざるをえない。

一般に、バチルス属が生産するアルカリプロテアーゼの生産性を向上させるためには、化学物質、

紫外線照射等による変異処理等を用いた菌株の育種や培養条件の改良等を行ない、生産性を向上させることが試みられている。ところが菌株または製造物の種類によってその効果の程度は様々であり、偶然性によるところが大きい。そこで合理的かつ理論的に生産性の高まる製造方法、すなわち遺伝子組換え技術を用いたY a 酵素の製造方法が望まれている。

また好アルカリ性細菌であるバチルス・エスピー Y 株は、アルカリ性の培地で培養を行なうために、栄養源の変質や培養液の着色等の様々な不都合が生じる。そのため中性付近での培養が可能になれば、培養工程や精製工程の簡略化が可能となり工業生産において有利である。

〔発明が解決しようとする課題〕

Y a 酵素の生産性を高めるためには、バチルス・エスピー Y 株を用いた従来の変異処理法を主体とした育種法では不十分な点がある。そこで本発明は、遺伝子組換え技術を用いることによりY a 酵素の生産性の向上に利用できるY a 酵素をコー

塩基配列とアミノ酸配列を有する。この配列中には、転写、翻訳開始に関する領域、前駆体領域と成熟蛋白領域とが含まれ、このうち、203残基目～635残基目のアミノ酸配列が成熟タンパク質に相当し、本発明において重要である。つまり、本発明によれば上記203～635（成熟酵素領域）残基の上流に位置するプロモーター領域、分泌のための領域等を公知の手段により他の蛋白質をコードする遺伝子のそれらと置換し、より効率的にY a 酵素を製造することができる。この際、本発明では、203～635残基の上流に位置するプロモーター領域をバチルス属細菌で強力に機能するようなプロモーター領域をもった遺伝子、例えばバチルス属細菌由来の中性又はアルカリプロテアーゼ又はアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域で置換したDNAをプラスミドに導入し、これをバチルス属細菌に導入することによって、中性領域（pH6～8近辺）で培養することによりY a 酵素を効率的に製造することができる。

第1図に示す塩基配列は、Y a 酵素遺伝子のク

ロニングにより決定できた。ここで用いるクローニング法としては、Y a 酵素をコードする遺伝子をクローニングできる方法であればいかなる方法でも構わないが、例えば下記に示すような大腸菌を宿主菌として、バチルス・エスピー Y 株染色体のDNA断片を保持する組換え体を作製し、Y a 酵素をコードする遺伝子と相補的なDNAを利用したハイブリダイゼーション法によってY a 酵素遺伝子をクローニングすることができる。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、Y a 酵素生産菌よりY a 酵素遺伝子を単離し、その塩基配列を決定することにより、又Y a 酵素遺伝子即ちY a 酵素のプロモーターからシグナルペプチド、前駆体領域、成熟酵素領域及びターミネーターまでをコードする領域を含むDNA断片を適当な宿主菌に導入することによりY a 酵素を生産し、さらにはプロモーター領域（以下、プロモーター領域とは一般的に大腸菌等で定義されるコンセンサス配列に加えて構造遺伝子の直前にあるShine-Dalgarno 配列を含む転写及び翻訳に關与する5'末端非翻訳領域とする。）を、その宿主菌において効率よく作動するような他の遺伝子由来のプロモーター領域に置換することによりY a 酵素を高生産化できることを見出し、該知見に基づいて完成された。

本発明に係るY a 酵素遺伝子は、第1図に示す

ローニングにより決定できた。ここで用いるクローニング法としては、Y a 酵素をコードする遺伝子をクローニングできる方法であればいかなる方法でも構わないが、例えば下記に示すような大腸菌を宿主菌として、バチルス・エスピー Y 株染色体のDNA断片を保持する組換え体を作製し、Y a 酵素をコードする遺伝子と相補的なDNAを利用したハイブリダイゼーション法によってY a 酵素遺伝子をクローニングすることができる。

Y a 酵素生産菌、例えばバチルス・エスピー Y 株からY a 酵素を精製し、必要に応じてトリプシン消化等により得られたY a 酵素断片等を用いてアミノ酸配列を決定し、このうち好適なアミノ酸配列に対応する一本鎖オリゴヌクレオチドをDNAプローブとして合成することができる。

次に、Y a 酵素生産菌より染色体DNAを抽出する。用いる菌株としてはY a 酵素を生産する菌株であればいかなる菌株でも構わないが、例えばバチルス・エスピー Y 株があげられる。染色体DNAを抽出する方法としてはサイトウーミウラ

の方法 (Biochim. Biophys. Acta, 72, 619 (1983)) 等によって調製することができる。

このように取得した染色体DNAをEcoRI、XbaIなどの制限酵素を用いて断片化し、アガロースゲル電気泳動に供し、合成したDNAプローブを用いてサザンハイブリダイゼーション (Molecular Cloning, 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 9.31 (1989)) を行ない、DNAプローブの相補性及びその相補するDNA断片の大きさを特定する。染色体DNAを消化する制限酵素は、他の制限酵素であっても構わない。DNAプローブは γ - 32 P-ATPを用いることによって標識することができる。

次に特定したDNA断片を回収する。回収方法はどのような方法でも構わないが、例えばDEAEペーパー法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 6.24 (1989)) を用いてそのDNA断片を回収することができる。

DNAを抽出し、前記と同様にサザンハイブリダイゼーションを行ない、DNAプローブと相補する組換えプラスミドを保持する菌株を選択することによりY_a酵素遺伝子を保持する形質転換株を取得することができる。

取得したY_a酵素遺伝子の塩基配列はSangerらの方法等 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5463 (1977)) により決定することができる。さらにその塩基配列によってY_a酵素のアミノ酸配列を解明することができる。

本発明のDNA配列は天然のDNA配列のみに限定されるのではなく、本発明により明らかにされたY_a酵素のアミノ酸配列をコードする他のDNA配列も含まれる。また、本酵素の特徴である耐界面活性剤性及び耐アルカリ性等のY_a酵素の機能を損なわない限りにおいて本発明のDNA配列及びアミノ酸配列に人為的な挿入、欠失、置換等を行なうことにより改造することは可能であり、本発明にはそのような変異遺伝子及び改質酵素蛋白質も含まれる。

さらに回収したDNA断片とベクターDNAとを連結する。そのDNA断片を消化した制限酵素と同じ制限酵素認識部位を持つベクターDNA、例えばpBR328、pUC118などを同一の制限酵素で消化する。さらにアルカリフェスファターゼで脱磷酸したのち同一の制限酵素認識部位を有するDNA断片とT4リガーゼにより連結することができる。この反応物をHanahanの方法 (DNA Cloning Vol. 1 IRL Press, p. 109 (1985)) に準じて大腸菌に導入することができる。

形質転換を行なった菌株の中からY_a酵素遺伝子を保持する菌株を選択する。選択方法にはコロニーハイブリダイゼーション法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.90 (1989)) 等、様々な方法を用いることができるが、例えば形質転換を行なった各菌株よりアルカリ-SDS法 (Molecular Cloning 2nd Edit., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25 (1989)) を用いて

Y_a酵素遺伝子を発現させるために、Y_a酵素遺伝子を適当な宿主菌に導入する。宿主菌としては、大腸菌、バチルス属、シェウドモナス (Pseudomonas) 属等の細菌、アスペルギルス (Aspergillus) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、カンジダ (Candida) 属等の微生物があげられるが他の宿主菌でも構わない。例えばバチルス属を宿主菌とした場合、Y_a酵素遺伝子を分断することなく消化する制限酵素と同じ制限酵素でベクタープラスミド、例えばpUB110、pBD64等を消化し、これとY_a酵素遺伝子をT4リガーゼを用いて連結させる。この反応物をプロトプラスト法 (S. Chang, Mol. Gen. Genet. 168, 111 (1979)) を用いてバチルス属細菌に導入することができる。Y_a酵素遺伝子を含むDNAを導入した宿主菌を培養し、その培養物よりY_a酵素を取得する。Y_a酵素の発現の確認及びその発現量はウエスタン・ブロッティング、蛋白質分解力の測定等により行なうことができる。

Y a 酵素の生産性を増大させるためには、プロモーター領域を宿主菌にとって効率のよいプロモーター領域と交換して発現させることにより、生産性を増大させることができる。例えばバチルス属細菌を宿主菌とした場合には、バチルス属細菌由来の中性またはアルカリプロテアーゼ遺伝子のプロモーター領域、アミラーゼ遺伝子のプロモーター領域等が好都合である。例えばY a 酵素遺伝子由来のプロモーター領域をバチルス・ライヘンホルミス (*Bacillus licheniformis*) 由来のアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換する。そして、例えばプロモーター領域後方部分に部位特異的変異法を用いて制限酵素認識部位、例えばBclI 認識部位等を作製し、制限酵素を用いたプロモーター領域の切除及びT 4 リガーゼを用いた連結等を行なうことによりプロモーター領域の交換を行なうことができる。さらにプロモーター領域の交換を行なったY a 酵素遺伝子をバチルス・サチルス (*Bacillus Subtilis*) に導入し、培養を行なうことによりY a 酵素を生産させる。これにより

もとのY a 酵素遺伝子由来のプロモーター領域を用いた場合に比べて生産性を増大させることができる。

上記に示す手法によりプロモーター領域を交換したY a 酵素遺伝子を含むプラスミドを保持するバチルス・サチルスを用いてY a 酵素の極めて高い生産性を獲得することができる。

上記バチルス・サチルスは、上記バチルス・サチルスが生育できる培地であればいずれでもかまわないが、例えば炭素源としてグルコース、澱粉、糖蜜等、窒素源としてはペプトン、ポリペプトンS、大豆粉、コーンステイブリーカー等、さらにミネラル等を含む培地を用いて温度30-40℃、50-100時間培養することができる。また培養物から陰イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過等により、Y a 酵素を精製できる。

以下に実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

〔実施例〕

実施例 1

サザンハイブリダイゼーション

Y a 酵素のN末端領域のアミノ酸配列をアブライド・バイオ・システムズ社 (ABI社) 製プロテインシーケンサー377Aを用いて決定した。結果は以下に示す通りであった。

N' -AsnAspValAlaArgGlyIleValLysAlaAspValAla
GlnAsnAsnTyrGly

Y a 酵素の中央部ないしC末端領域のアミノ酸配列を解析するため、トリブシン消化により得られた試料を用いて同様の操作を行なった。その結果を以下に示す。

N' -LysTyrAlaTyrMetGlyGlyThrSerMetAlaThr

これらの解析結果よりイノシン法に基いて以下に示すオリゴヌクレオチドDNAをABI社製DNA合成装置381Aを用いて作製した。

A A T

プローブN: 5' CCATA TT TT TGIGCIACATCIGC 3'

G G C

A T

プローブC: 5' GTICCCICCATATAIGC TA TT 3'

G C

上記プローブについては、 γ - 32 P-dATP (アマシウム社製) 及びT 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製) を用いて5' 末端を 32 Pで標識した。

バチルス・エスピー Y株をNa₂CO₃ 10g/lを含むブイヨン培地 (極東製薬社製) 200mlを含む坂口フラスコに植菌し、30℃で終夜培養した。菌体約2gを取得し、サイトウーミウラの方法に準じて染色体DNAを2.8mg調製した。このDNA10μgをEcoRI (制限酵素はすべて宝酒造製) またはXbaIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、先に調製したプローブNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、EcoRIで消化した染色体DNA断片では、約2.8KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2KbpのDNA断片がハイブリダイズした。さらに同操作をプローブCにつ

いても行なったところ、EcoRIで消化した染色体DNA断片では約2.0 KbpのDNA断片が、またXbaIで消化した断片では約1.2 KbpのDNA断片がハイブリダイズした。

クローニング

前述の染色体DNA 200 μ gをEcoRIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、約2.8 KbpのDNA断片をDEAEペーパー法を用いて20 μ g回収した。また約2.0 KbpのDNA断片についても同様の操作を行ない20 μ g回収した。染色体DNA 200 μ gをXbaIで消化し同様の操作を行ない約1.2 KbpのDNA断片を10 μ g回収した。pBR328(ペーリンガー社製)1 μ gをEcoRIで消化しアルカリフェスファターゼ(ペーリンガー社製)で脱燐酸後、フェノール抽出、すなわちフェノール-クロロホルム混液(1:1)を加え蛋白質変性を行ない、遠心分離後上清を回収する操作を行なった。さらにエタノール沈殿、すなわち0.1倍量の3M酢酸ナトリウム(pH4.8)及び2倍量のエタノールを加え-80

ライゲーションキットを用いて連結し、同様の操作をプローブNを用いて行なった。その結果プローブNとハイブリダイズするプラスミドpYX1(第4図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。

塩基配列の決定

取得したプラスミドpYX1、pYB2及びpYX1のY_a酵素遺伝子の一部をpUC118及びpUC119(宝酒造社製)にサブクローニングし、宝酒造社製のマニュアルに従って1本鎖DNAを調製した。この1本鎖DNAと α -³²S-dCTP(アマシヤム社製>37TBq/mmol)及びSEQUENASE(東洋紡社製)を用いて塩基配列の決定を行なった。この結果得られた塩基配列を第1図に示す。218bpから2122bpに存在するオープン・リーディングフレームより解明されたアミノ酸配列には、前述のY_a酵素のプロネンシークエンサーによるアミノ酸配列の解析により確認されたアミノ酸配列と一致する配列が203残基目からと448残基目からに見いだせる。ま

で10分冷却後遠心分離によりDNAを回収する操作を行なった。このうち0.2 μ gと前述の約2.8 KbpのEcoRI断片0.05 μ gをライゲーションキット(宝酒造社製)を用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌HB101株に導入した。生育した形質転換体500株よりアルカリSDS法を用いてDNAを抽出し、前記のプローブNを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果プローブNとハイブリダイズするプラスミドpYT101(第2図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。さらに約2 KbpのEcoRI断片についても前述のプローブCを用いて同様の操作を行ない、プローブCとハイブリダイズするプラスミドpYB2(第3図)を見だし、そのプラスミドを保持する菌株を取得した。また、pUC118(宝酒造社製)1 μ gをXbaIで消化しアルカリフェスファターゼで脱燐酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なった。このうち0.2 μ gと前述の約1.2 KbpのXbaI断片0.05 μ gを

たN末端が203残基目から始まることから、翻訳開始から202残基目までが前駆体領域であり、203残基目以降が成熟酵素を構成する領域と判断される。

実施例 2

プロモーターの取得

パテルス・ライヘンホルミスLB8907株をブイヨン培地200 mlを含む坂口フラスコに植菌し、30℃で終夜培養を行ない、菌体約1gを取得し、サイトウ・ミウラの方法に準じて染色体DNAを2.0 μ g調製した。このうち50 μ gをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった。pUC118 1 μ gをEcoRIで消化後アルカリフェスファターゼを用いて脱燐酸し、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない、このうち0.2 μ gと染色体DNAのEcoRI断片0.05 μ gをライゲーションキットを用いて連結し、この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体を1%サツマイモデンプン(純正化学社製)を含む

し培地(バクトトリプトン10g/l、バクトイーストエキス5g/l、NaCl 5g/l、バクタガー20g/l、アンピシリン10mg/l、pH7.2)に植菌し37℃で約40時間培養した。その結果形質転換体2000株より、デンブンを分解する、即ちアミラーゼ遺伝子を有する菌株を1株取得した。この菌株が保持するプラスミドpTA1(第5図)のプロモーター領域の塩基配列を実施例1に準じて決定し、その結果を第6図に示す。

Y_a酵素を発現しうるプラスミドの作製

プラスミドpYB2 50μgをEcoRI及びSphIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05μgと、あらかじめEcoRI、SphIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収したpUC118 0.2μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生

育した形質転換体の中から第7図に示すpUC118ESを保持する菌株を取得した。pYT101 50μgをEcoRIで消化しDEAEペーパー法を用いて約2.7KbpのDNA断片を回収した。そのうち0.05μgと、あらかじめEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼを用いて脱磷酸処理後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収したpUC118ES 0.2μgをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入し、生育した形質転換体の中から第7図に示すpTB3を保持する菌株を取得した。

ABI社製DNA合成装置381A型を用いて下記に示すDNAプローブ(第1図の1181-1210bpに対応)を合成し、



宝酒造社製部位特異的変異法キットMutan-Kを用いて、pTB3のY_a酵素のアミノ酸配列を変えずに塩基配列を改変し、EcoRI部位を消失させたプラスミドpTB3Eを取得した。さらに下記

に示すDNAプローブ(第1図の200-229bpに対応)を合成し、



同様にして塩基配列を改変し、Y_a酵素翻訳開始コドン上流にBclI認識部位を作製したプラスミドpTB3EBを取得した。

また下記に示すDNAプローブを合成し、(第6図の216-245bpに対応)を合成し、



同様にしてpTA1の塩基配列を改変し、プロモーター領域下流にBclI認識部位を持つプラスミドpTA1Bを作製した。

pUC118 1μgをEcoRIで消化しアルカリフォスファターゼで脱磷酸後、フェノール処理、エタノール沈殿を行ない回収した。このうち0.2μgとあらかじめEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行い回収したpUB110 0.05μgをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌JM109株に導入した。生育した形

質転換体の中から第8図に示すプラスミドpUB81を保持する菌株を取得した。pTB3E 5μgをEcoRIで消化し、フェノール処理、エタノール沈殿を行なった後、クレノウフラグメント(宝酒造社製)を用いてDNA末端を平滑化した。さらにフェノール抽出、エタノール沈殿を行い、このうち0.2μgとSphIリンカー(ニューイングランドバイオラブ社製)50ngをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法を用いて大腸菌JM109株に導入した。生育した形質転換体のうちSphI認識部位が新たに作製されたプラスミドpTB3ES(第8図)を保持する菌株を取得した。pTB3ES 50μgをSphIで消化し、DEAEペーパー法を用いて4.6KbpのDNA断片を回収した。このDNA断片0.05μgと、SphIで消化し、フェノール抽出、エタノール沈殿を行なったpUB81 0.2μgとをライゲーションキットを用いて連結した。この反応物をプロトプラスト法を用いてバチルス・サチルス1012株に導入した。生育し

た形質転換体のうち第8図に示すプラスミド pUB 8 Y を保持する菌株を取得した。

p T A 1 B 5 0 μg を E c o R I 及び B c l I で消化し、D E A E ペーパー法を用いて約 1 Kbp の D N A 断片を回収した。p T B 3 E B 1 μg を E c o R I 及び B c l I で消化しアルカリフォスファターゼで脱燐酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ない回収した。このうち 0.2 μg と前記の p T A 1 B 由来の 1 Kbp D N A 断片 0.05 μg とをライゲーション・キットを用いて連結した。この反応物をハナハンの方法に準じて大腸菌 J M 1 0 9 株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミド p A Y 1 を保持する菌株を取得した。

p A Y 1 5 0 μg を S p h I、さらにベクター側のフラグメントを分断するため X m n I で消化し、D E A E ペーパー法を用いて約 3.5 Kb の D N A 断片を回収した。p U B 8 1 1 μg を S p h I で消化しアルカリフォスファターゼで脱燐酸後、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ない回収した。

を遊離させる酵素量を 1 アルカリプロテアーゼ単位 (A P U) とした。各培養上清のアルカリプロテアーゼ活性の結果を表-1に示す。p U B 8 Y を保持する形質転換体のアルカリプロテアーゼの生産量は、p U B 1 1 0 を保持する形質転換体に比べて約 3 倍高く、また p U B 8 A を保持する形質転換体は、p U B 8 Y を保持する形質転換体に比べて約 3 0 倍の高い Y a 酵素の生産性を示した。

このうち 0.2 μg と前述した p A Y 1 由来の 3.5 Kb D N A 断片 0.05 μg をライゲーションキットを用いて連結した。この反応物を、プロトプラスト法を用いてバチルス・サチルス 1 0 1 2 株に導入した。生育した形質転換体のうち第9図に示すプラスミド p U B 8 A を保持する菌株を取得した。

Y a 酵素の発現

p U B 1 1 0、p U B 8 Y、p U B 8 A を保持するバチルス・サチルス 1 0 1 2 株の形質転換体を以下に組成を示す培地 (谷性澱粉 9 0 g / l、ポリペプトン S (大五栄養社製) 5 0 g / l、K₂HPO₄ 5 g / l、MgSO₄ · 7 H₂O 0.2 g / l、硫酸カナマイシン 5 0 mg / l、pH 7.5) を含む坂口フラスコに植菌し 33℃にて 9 0 時間培養した。培養上清のアルカリプロテアーゼ活性はアンソニー-萩原の変法 (Hagiwara, B., J.

Biochem. 45, 188 (1958)) に準じて測定した。すなわち 35℃、pH 10.5 の条件下で 1 0 分間反応し、1 分間にチロシン 1 μg 相当量

表 1

	APU/ml
Bacillus subtilis 1012 (pUB8Y)	850
(pUB8A)	25400
(pUB110)	320

4. 図面の簡単な説明

第1図は、Y a 酵素遺伝子の構造遺伝子領域の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第2図は、Y a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子の N 末端側及びプロモーター領域を保持するプラスミド p Y T 1 0 1 の制限酵素切断地図である。

第3図は、Y a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子 C 末端側及びターミネーター領域を保持するプラスミド p Y B 2 の制限酵素切断地図である。

第4図は、Y a 酵素遺伝子のうち構造遺伝子中央部を保持するプラスミド p Y X 1 の制限酵素切

断地図である。

第5図は、バチルス・ライヘンホルミスL88907より単離したアミラーゼ遺伝子を保持するプラスミドpT A1の制限酵素切断地図である。

第6図は、バチルス・ライヘンホルミスL88907より単離したアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域近傍の塩基配列およびそれに対応するアミノ酸配列である。

第7図は、pYT101とpYB2のYa酵素遺伝子の領域を連結したプラスミドpTB3の作製行程図である。

第8図は、pTB3のうちYa酵素遺伝子の領域をバチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Yの作製行程図である。

第9図は、pTB3EBのYa酵素遺伝子のプロモーター領域をpTA1Bのアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域に交換し、バチルス属細菌で複製可能なプラスミドpUB110に連結したプラスミドpUB8Aの作製行程図である。

Ba BamH I EcoRI
Bg BglII ClaI
E : EcoRI H : HindIII
K : KpnI P : PstI
S : SphI XbaI
Xm : XmaI
AP : アルカリフォスファターゼ
MCS : マルチクローニングサイト
A^r : アンピシリン耐性遺伝子
T^c : テトラサイクリン耐性遺伝子
ori : 複製領域。

図面の浄書

第1図 Ya酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その1)

```

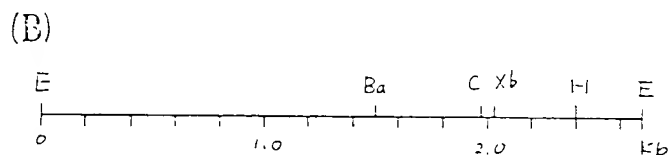
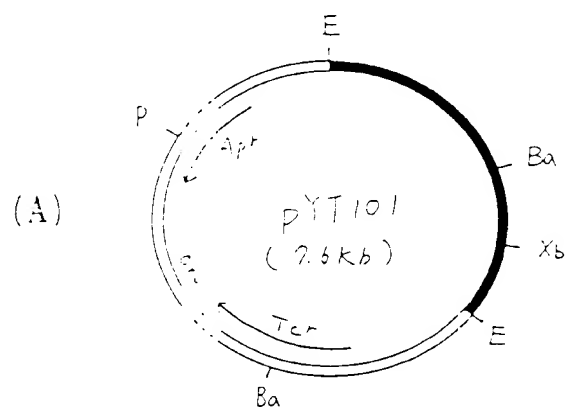
GCATCCAGTACATTTGGGTAAGTGTCTAGCGGTGTTTCTTCAAGAACAAATGCTTTTTT 64
1
TTGTTTAACTAATGTCATCTTTTCCATCGGAAATAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 65
65
AATGTAAGTACGTAATTTCCCAATACCGGAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 130
131
AAGATCAGCGTTCGAGCAATTCAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 196
197
1
HelLysGlyLysLysArgValValLeuSerValValAlaSerAla 15
AAGATCAGCGTTCGAGCAATTCAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 262
197
16
AlaIleLeuAlaSerValHeIValSerSerProThrSerGlyAlaAspPheGlnValAlaAsn 37
CGCATCTTAGCGTCAGTATGCTTAGTCCACCACTAGTGGGCGACATTTTCAAGTGAATTTAAT 328
263
38
GlyValLysSerLeuGluAsnAlaSerLeuValLysProIleSerSerGlyGluAlaSerPheLeu 59
CGGTGCAAGTTTACAAATGCTAGTTTGGTTAAACGATAAGTAGCGGTGAGGCGATCTTTCTA 394
60
ValAspThrGluAsnIleAsnIleProLysGlyIleGlnLysLysLeuGluAlaValGlnLysAsp 81
GTACATACCGAAATATTATATATCTCTAAGCTATTCAAAAGAGCTAGACAGCAGTACAGAGCAT 395
395
82
AsnGluLeuTyrIleValGlnPheThrGlyProIleSerGluGluGluArgLysGlyLeuGluSer 103
AAGCACTCTACATCGTACAAATTTACTGGACCAATTTTCAGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 461
461
104
LeuGlyValSerIleLeuAspTyrValProAspTyrAlaPheIleValGlnTyrSerGlyAlaThr 125
CTAGCAGTATCGATCTCATATTATGTTCCAGATTATGCTTTTATTTGTTTCAGTATATGTTGCTACA 527
527
128
LysAsnIleSerThrLeuHisSerValGluAsnValGlnProPheLeuProLeuTyrLysIleAsp 147
AATAATATAGTACTTTACATTTCTGTGTGAGAGGCTACAGCATTTTATTACCATTAATAAATTGAT 593
593

```

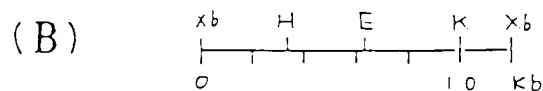
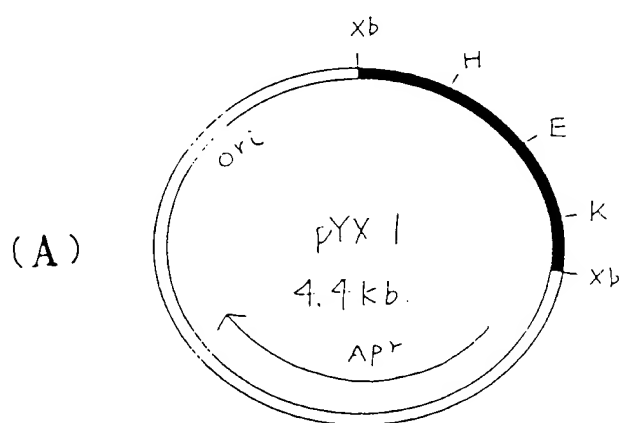
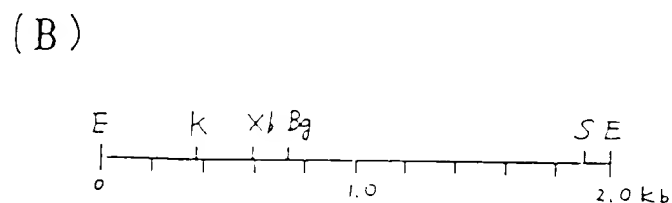
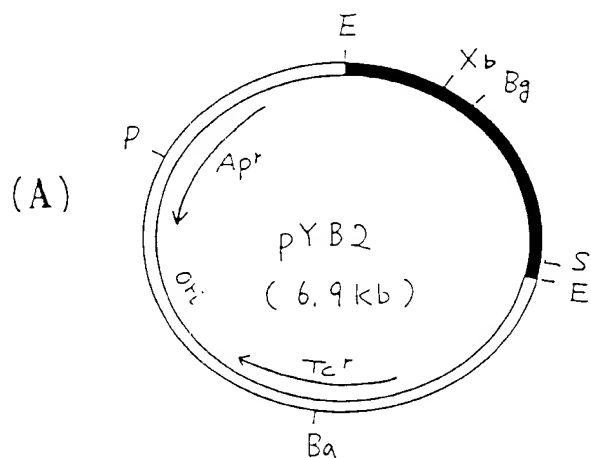

図面の説明

第 1 図 Y 酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その4)

588	TyrProTyrAspAsnAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValIGluAsnValIPheIleAsnAlaProGln	609
1979	TATCCTTATGATAATAACTGGCGATGGTCGCAACAATGTTGAGAACCTATTATAACGCCCTCCGAA	2044
610	SerGlyThrTyrIleIleGluValIGlnAlaTyrAsnValIProSerGlyProGlnArgPheSerLeu	631
2045	TCTGCAACGTATATAATTGAGGTTCAAGCGCTATAATGTACCATCTCGGCCACACAGGTTTTCACCTA	2110
632	AlaIleValIHis	2176
2111	GCTATCGTACATTATATTTTTTAATGAGAAAAGTAAAGGATTTTCACCTTACCTTTTTCCTCA	
2177	TTTTGTCAAGGATTATATTTTTTCCAGCACTATGGAAGCTA	

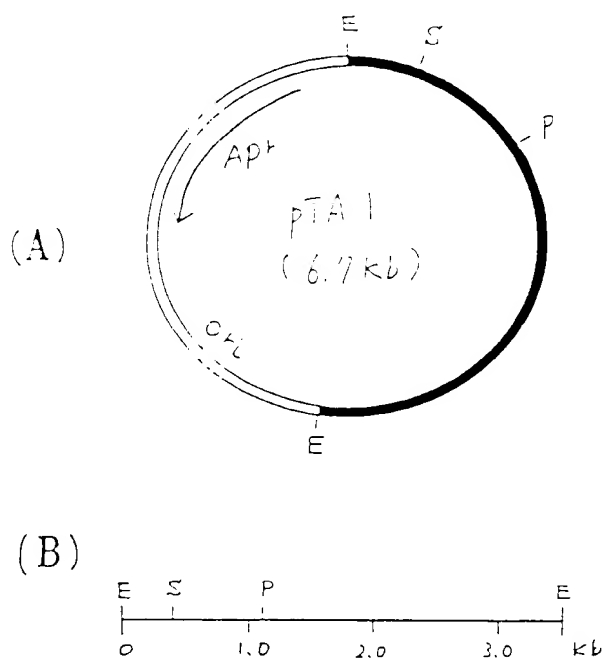


第 2 図



第 3 図

第 4 図



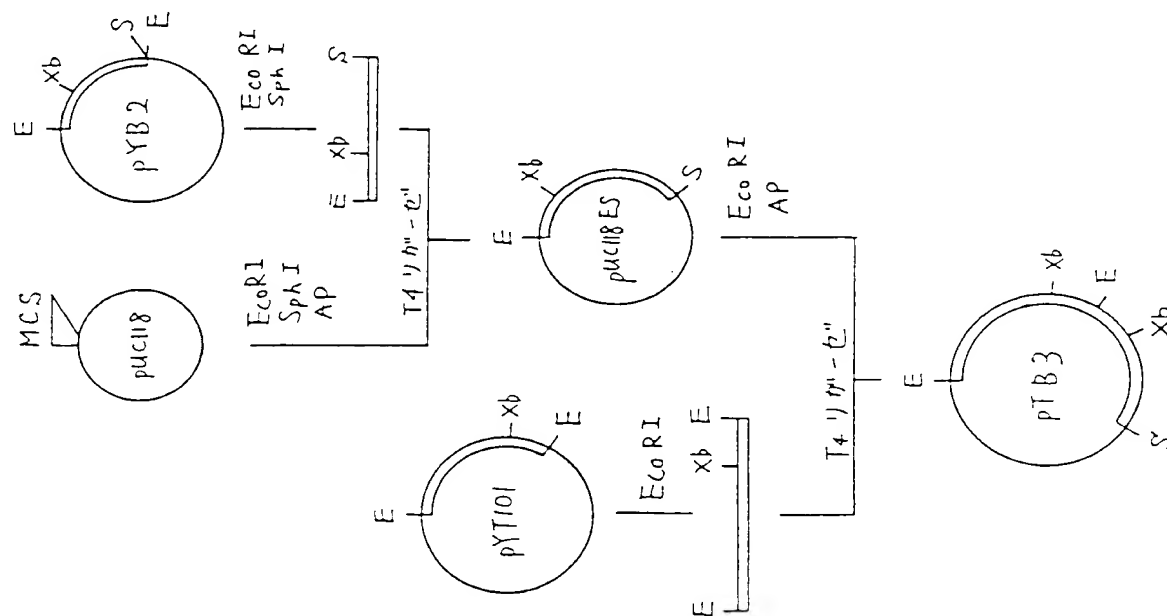
第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

```

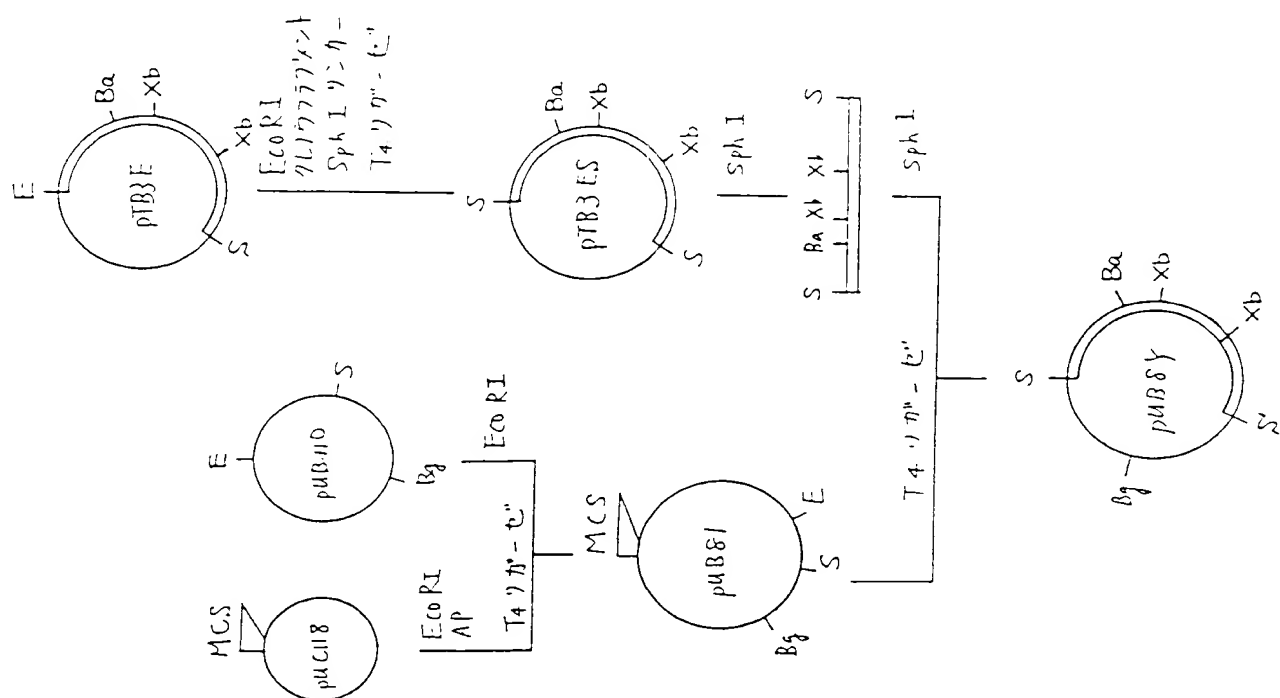
CAACGTCGCACATGCTGCTCAAGAGATTATTAAGCTGAAAGCAAAAGGCTATCAATT
1 60
GGTAACCTGTATCTCAGCTTGAAGAAGTGAAGAACGAGAGAGGCTATTGAATAAATGACTA
61 120
GAAAGCGCCATATCGCTTTTCTTTTGGAAAGAAATATAGGAAATCGTATTTGTTAAAA
121 180
1 2
MetLys
ATTCTGAATATTTATACAATATCATATGTTTCACATTGAAAGCGGAGGAGAATCATGAAA
181 240
3 33
GlnGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu
CAACAAAAACGGCTTTACGCCCGATTGCTGCCGCTGTTATTTGGGCTCATCTTCTGCTG
241 300
34 37
ProHisSerAla
CCTCATTCTCCA
301 312

```

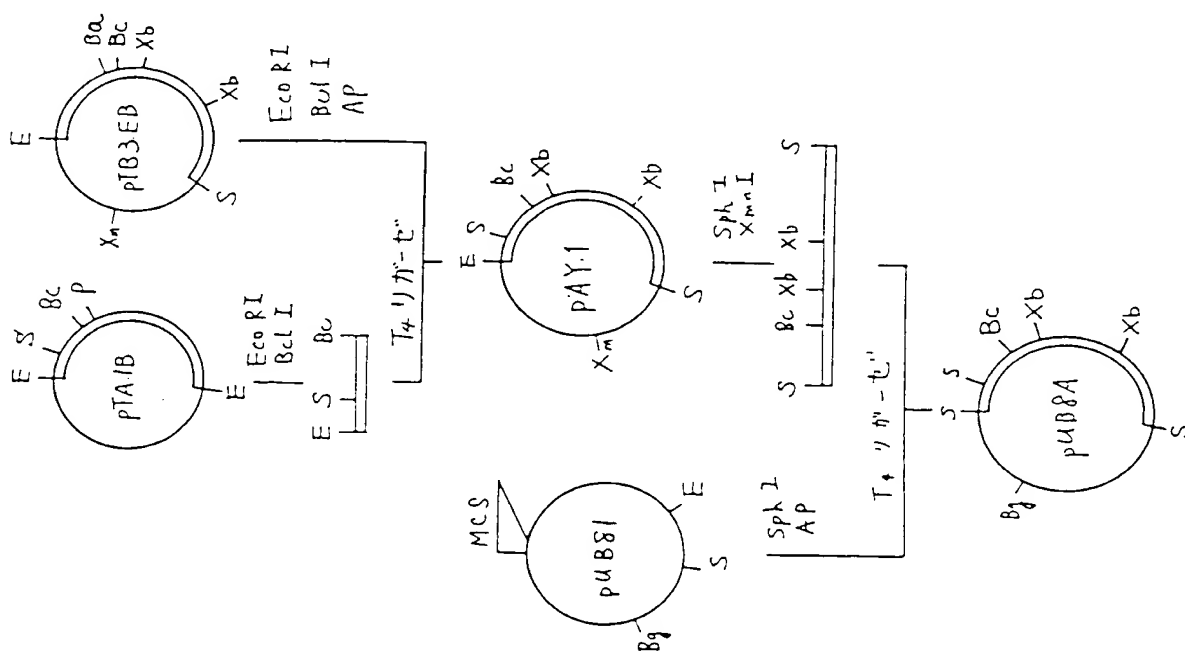
第 5 図



第 7 図



第 8 図



第 9 図

手続補正書(方式)

平成 3 年 8 月 27 日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示 平成2年特許願第327110号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY a 酵素を
コードするDNA及び該DNAを
用いたアルカリプロテアーゼY a
の製造方法3. 補正をする者
事件との関係 出願人

名称 (676) ライオン株式会社

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

氏名 (5995) 弁理士 中 村 稔

5. 補正命令の日付 平成3年3月12日

6. 補正の対象 図面

7. 補正の内容

図面の第1図(その3)、(その4)及び(その5)
を別紙の通り補正する。

(1) 明細書の以下の箇所を以下の通り補正する。

頁	行	誤	正
6	下から4	計算	生産
11	10	染色体菌	染色体
15	下から2	Subtilis	subtilis
16	12	コーンステイ ンブリカー	コーンステイ ンブリカー
21	下から 4~3	プロネンシー クエンサー	プロティンシー クエンサー

(2) 図面の第1図(その3)、第十四(その1)、
第6図及び第9図を別紙の通り補正する。

手続補正書(方式)

平成 3 年 8 月 27 日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示 平成2年特許願第327110号

2. 発明の名称 アルカリプロテアーゼY a 酵素を
コードするDNA及び該DNAを
用いたアルカリプロテアーゼY a
の製造方法3. 補正をする者
事件との関係 出願人

名称 (676) ライオン株式会社

4. 代理人

住所 東京都千代田区丸の内3丁目3番1号
電話(代) 3211-8741

氏名 (5995) 弁理士 中 村 稔

5. 補正命令の日付 自 発

6. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄
図面

7. 補正の内容

第 1 図 Y 酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その3)

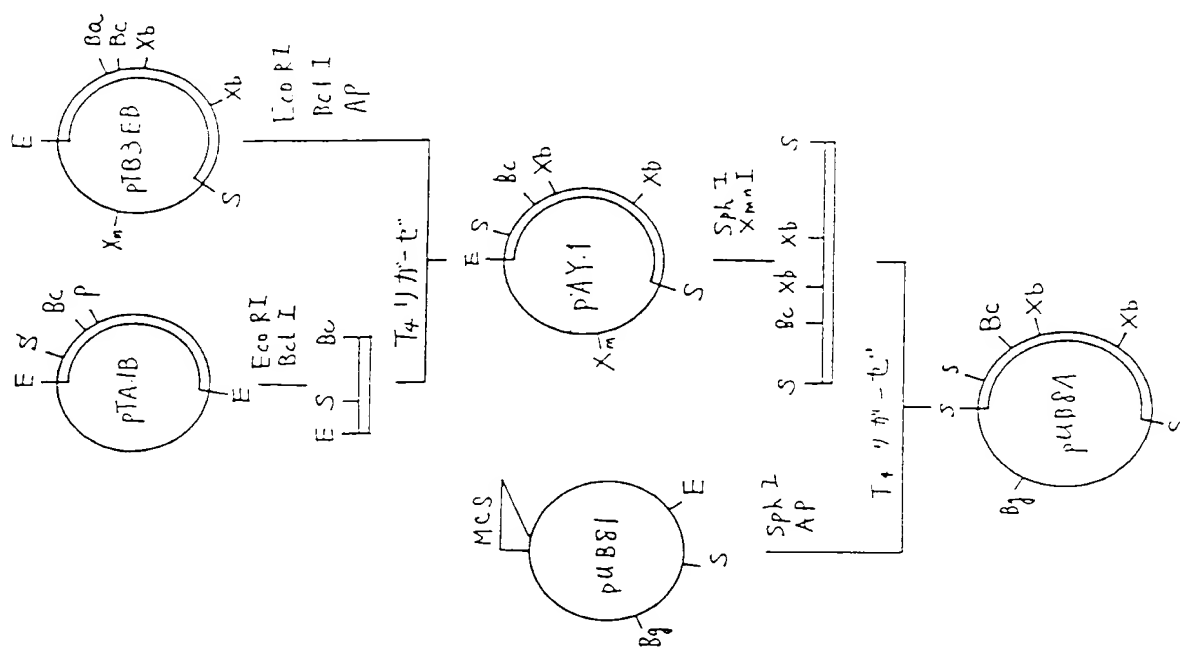
368	SerGlyThrIleSerAlaProGlyThrAlaLysAsnAlaIleThrValGlyAlaThrGluAsnTyr	389
	TCAGCAACATTAGTCTCCAGGTACACGCAAAATGCTATTACGGTCGGCGCAACCGCAAACTAT	
1319		1384
390	ArgProSerPheGlySerIleAlaAspAsnProAsnIleIleAlaGlnPheSerSerArgGlyAla	411
	CGCCCAAGCTTCGGTTCGATACGACGATACCCAAATCATATTCGACAATTTTTCATCCAGACAGCT	
1385		1450
412	ThrArgAspGlyArgIleLysProAspValThrAlaProGlyThrPheIleLeuSerAlaArgSer	439
	ACGACGATGCAATTAACCTGACGTACACGCTCTGGACATTTATTTTATCATGACACGTTCT	
1451		1516
440	SerLeuAlaProAspSerSerPheTrpAlaAsnTyrAsnSerLysTyrAlaTyrMetGlyGlyThr	455
	TCCTTAGCTCCAGACTCTTCGTTTCGGCGAATTATAACAGTAAATATCGGTATATCGCGGTATCC	
1487		1582
456	SerIleAlaThrProIleValAlaGlyAsnValAlaGlnLeuArgGluIlePheIleLysAsnArg	477
	TCCATGCCGACACCTATTGTTCCAGCGAATGTCGCCAATTACGTGACCATTTTATAAAAAATAGA	
1583		1648
478	GlyIleThrProLysProSerLeuIleLysAlaAlaLeuIleAlaGlyAlaThrAspValGlyLeu	499
	GGTATTACTCTCAAGCTCTTTAATAAAGCTGACATTATTCGCTGGTCTACATGATGTTGGTTTA	
1649		1714
500	GlyTyrProSerGlyAspGlyTrpGlyArgValThrLeuAspLysSerLeuAsnValAlaTyr	521
	GGATATCTTAGTGGTACCAAGCTGGCGGCTGTTACTCTAGATAAATGCTAAATGATCGGTAT	
1715		1780
522	ValAsnGluAlaThrAlaLeuAlaThrGlyGlnLysAlaThrTyrSerPheGlnAlaGlnAlaGly	543
	GTCAATCAAGCAACTGCATTACCCACAGCACAAAAGCAAGTATTCGTTCCAGACGACAGCGGT	
1781		1846
544	LysProLeuLysIleSerLeuValTrpThrAspAlaProGlySerThrAlaSerTyrThrLeu	565
	AAACCTTTAAAAATCTCGTTAGTATGGACACATGCTCTCGCAAGTACAACTGCTATTATTACACTA	
1847		1912
566	ValAsnAspLeuAspLeuValIleThrAlaProAsnGlyGlnLysTyrValGlyAsnAspPheSer	587
	GTTAATGATTAGATCTAGTTTACTGCTCCGAAATGCAAAATAATGATGATGATTTTATG	
1913		1978

第 1 図 Y 酵素遺伝子塩基配列とアミノ酸配列 (その4)

588	TyrProTyrAspAsnTrpAspGlyArgAsnAsnValGluAsnValPheIleAsnAlaProGln	609
	TATCCTTATGATAATAACTGGCATGGTCCCAACAATGTTGAGAACGCTATTATATAAAGCTCCGCA	
1979		2044
610	SerGlyThrTyrIleIleGluValGlnAlaTyrAsnValProSerGlyProGlnArgPheSerLeu	631
	TCGGAACGTATATAATTGAGTTCAAGCGTATAATGTACCATCTCGCCCAACAGCGTTTCTCACTA	
2045		2110
632	AlaIleValHis	635
	GCTACGTACATTAAATTTTTTAATGAGAAAAAAGTAAGGATTTTTCAGCTTAGTTTTTCTCAT	
2111		2176
	TTTGTTCAACGATTATATTTTTTCCAGCACTATGGAAGCTA	
2177		

第 6 図 アミラーゼ・プロモーター遺伝子の塩基配列

CAAGTCGCAGATGCTGCTGAAGAGATTATTAAGCTGAAGGCAAAAGGCTATCAATT	
1	60
GGTAAGTGTATCTAGCTTGAAGAGAGCAAGCAAGCAGAGAGGCTATTGTAATAATGAGTA	
61	120
CAAGGCCATATCGCTTTCTTTTGGAGAAATATAGGCAAAATGCTATTGTTAATA	
121	180
ATTCTGATTTTATACATATCATATGTTTCATTTGAAGGGGAGGAGCAATCATGAA	
181	240
3	33
GlnGlnLysArgLysTyrAlaArgLeuLeuProLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeu	
CAACAAAAGCGCTTACCGCGGATGCTGCGGTGTTATTTCGCTCATCTCTCTGCTG	
241	300
34	37
ProHisSerAla	
CGTCATCTGCA	



第 9 図